

Title: **JP2000041674A2: ANTIBACTERIAL MONOCLONAL ANTIBODY**

Country: **JP Japan**

Kind: **A2 Document Laid open to Public inspection**

Inventor(s): **DAPHNA BROWSKY**

Applicant/Assignee: **KONBAKUTO DIAGNOSTIC SYST LTD**



News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: **Feb. 15, 2000 / July 21, 1998**

Application Number: **JP1998000219900**

IPC Class: **C12N 15/02; A61K 39/07; A61K 39/104; A61K 39/108;  
A61K 39/112; A61K 39/395; C07K 14/21; C07K 14/24;  
C07K 14/26; C07K 14/265; C07K 14/425; C07K 16/12;  
C12N 5/10; G01N 33/577; C12P 21/08;**

Priority Number(s): **July 21, 1998 JP1998000219900**

Abstract: **Problem to be solved:** To obtain a new cell strain of a hybridoma cell strain producing a monoclonal antibody capable of binding with a specific bacterial cell to a large extent, and useful for diagnosis of bacterial infection as an indicator of the presence of the bacterial infection.



**Solution:** This new hybridoma cell strain can produce a monoclonal antibody capable of binding with a specific bacterial cell such as E. coli, Enterobacteriaceae, Proteus, Klebsiella and Pseudomonas to a large extent, and capable of binding with an unspecified bacterial cell to a small extent or not binding with the unspecified bacterial cell. The cell strain can be used for production or the like of the monoclonal antibody useful for diagnosis or the like of the bacterial infection of an individual. The cell strain is obtained by subjecting a spleen cell of a mouse immunized by the bacterial cell to a somatic cell hybridization with a myeloma cell strain, and cloning the objective antibody-producing strain.

**COPYRIGHT: (C)2000,JPO**

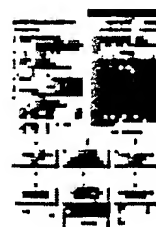
Family: **none**

Other Abstract Info: **none**

Foreign References: **No patents reference this one**



**Nominate this  
for the Gallery...**



[View  
Image](#)

[1 page](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-41674  
(P2000-41674A)

(43) 公開日 平成12年2月15日 (2000.2.15)

| (51) Int.Cl.                         | 識別記号   | F I           | テマコード (参考)  |
|--------------------------------------|--------|---------------|-------------|
| C 1 2 N                              | 15/02  | C 1 2 N 15/00 | C 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K                              | 39/07  | A 6 1 K 39/07 | 4 B 0 6 4   |
|                                      | 39/104 | 39/104        | 4 B 0 6 5   |
|                                      | 39/108 | 39/108        | 4 C 0 8 5   |
|                                      | 39/112 | 39/112        | 4 H 0 4 5   |
| 審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 14 頁) 最終頁に続く |        |               |             |

(21) 出願番号 特願平10-219900

(22) 出願日 平成10年7月21日 (1998.7.21)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年5月17日～5月21日 開催の「アメリカン・ソサイエティ・フォー・マイクロバイオロジー 第98回総会」において文書をもって発表

(71) 出願人 598103978

コンパクト・ダイアグノスティック・システムズ・リミテッド  
イスラエル・ヘルツリヤ46766・メデイナ  
トハエフデウムストリート60

(72) 発明者 ダフナ・プロウスキ

イスラエル・テルーアビブ69419・ロメマ  
ストリート7

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗細菌モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 抗細菌モノクローナル抗体およびその産生ハイブリドーマ。

【解決手段】 他の種類の細菌細胞へのそれらの小さな程度の結合もしくは結合のないことに比較して大きな程度特定の細菌細胞に結合することが可能なMA bを産生するハイブリドーマ細胞株。MA bは、主に、培養により成長することが比較的容易である細菌細胞に大きな程度結合することが可能なものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定の細菌細胞に大きな程度結合することが可能なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株であって、前記抗体が不特定の細菌細胞に小さな程度結合可能であるかもしくは全く結合できないハイブリドーマ細胞株。

【請求項2】 (i) 抗大腸菌(*E. coli*)特異的MA b、抗腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)特異的MA b、抗プロテウス属(*Proteus*)特異的MA b、抗クレブシエラ属(*Klebsiella*)特異的MA bもしくは抗シュードモナス属(*Pseudomonas*)特異的MA b；

(ii) 抗体全体の抗原結合性の特徴を保持する(i)の抗体の断片；ならびに

(iii) 上の(i)および(ii)の抗体のいずれか1種により結合される抗原エピトープに結合することが可能な抗体、から成る群から選択される、請求項1に記載のハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体。

【請求項3】 適するキャリアーと共に請求項2の最低1種のモノクローナル抗体もしくはその断片を含んで成る診断試薬組成物。

【請求項4】 請求項2の抗体のいずれか1種に結合することが可能な抗原。

【請求項5】 請求項2の抗体の最低1種を含んで成る、細菌感染症の診断もしくは治療における使用のためのキット。

【請求項6】 請求項4に記載の最低1種の抗原を含んで成る、細菌感染症の診断もしくは治療における使用のためのキット。

【請求項7】 (i) 試験されるべき個体に由来する流体試料を得ること；

(ii) 前記得られた試料から多数のサンプルを調製すること；

(iii) 請求項3に従った診断試薬組成物であって、それぞれが異なる1種の抗細菌特異的MA bを含んで成り、前記MA bのそれぞれが抗体-抗原複合体の形成を許す条件下で検出可能な標識で標識されている組成物と前記サンプルのそれぞれを反応させること、ならびに

(iv) 前記特定の細菌に対する前記診断試薬組成物のそれぞれの結合の程度を検出し、対照サンプルで観察されるものより有意に高い結合のレベルが、サンプル中の前記特定の感染性細菌の存在を示すものとして、前記試験される個体における細菌感染の存在の指標とすること、の段階を含んで成る、個体における細菌感染の診断法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術的分野】 本発明は、抗細菌抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、当該細胞株により産生される抗体およびそれらの多様な用途に関する。

【0002】 以下の用語が下の記述全体で使用されるで

あろう。すなわち、感染性細菌一個体において感染症を引き起こすことが可能である細菌。感染性細菌は、通常は存在せずかつ一旦存在するや感染症を生じさせる細菌でありうる。感染性細菌はまた、通常存在するがしかし低濃度である細菌であってもよく、感染症はその場合それらの濃度の増大の結果である。こうした細菌はまた、それらの本来の形態で正常の身体微生物叢の一部を形成しうるが、しかし遺伝的突然変異の結果として感染性になりうる。臨床サンプルにおいて、ある臨界レベルより上の感染性細菌の存在は感染症の兆候と考えられる。

【0003】 非特異的細菌モノクローナル抗体(MA b) - 1種以上の型の細菌株に属する細胞により発現される抗原に結合することが可能であるMA b。

【0004】 特異的抗細菌MA b - 他の細菌群に属する細菌細胞により発現される抗原に対してよりもずっと大きな程度、特定の細菌群(すなわち、科、属、種もしくは株)の細菌細胞により発現される抗原に結合するMA b。

【0005】 抗体感受性 - それに対し抗体が特異的である株、種、属もしくは科に属する細胞(特異的細胞)を含有するサンプルを同定する抗体の能力の尺度。これは、典型的には、特異的抗体が結合する特定の細胞を含有する試験サンプルのパーセントを決定することにより測定される。抗体は、それが、特定の細胞を含有する試験サンプルの最低90%に結合することが可能である場合に感受性抗体であるとみなし得る。

【0006】 抗体特異性 - 特定の細胞を含有するサンプルと他の細胞(不特定細胞)含有するものとを区別する抗体の能力の尺度。これは、典型的には、抗体が結合する不特定細胞を含有する試験されたサンプルのパーセントを決定することにより測定される。抗体は、一方でそれが高感受性を有し、かつ、他方で、不特定細胞を含有しかつ特定の細胞を含有しないサンプルの10%以下に結合する場合、高特異性を有すると見なし得る。

【0007】

【従来の技術】 試験されるサンプル中の感染性細菌の存在の決定および当該サンプル中の特定の型の感染性細菌の型の同定は、医学的診断試験、水および食物の品質管理試験、大気汚染試験などを包含する多くの分野で実施される試験においてきわめて重要である。医学的分野において、試験される体液サンプルの臨床診断はとりわけ重要である。なぜなら、当該サンプル中の感染性細菌の型の適正な同定は、適正な診断、治療レジメンおよび感染した個体の予後に決定的に重要な影響を有しうるからである。感染性細菌のこうした正確な同定はまた、疫学の目的上必要でもあり、かつ、感染した水、食物、化粧品および製薬学的サンプルの評価においてもまたとりわけ重要であり、ここで感染源が同定されかつ適正に治療されなければならない。

【0008】 サンプル中の感染性細菌の同定に今日まで

使用されるアッセイの大部分は、当該サンプル中に存在する個々の単離されたコロニーを成長させるため、試験されるサンプルを培養しそして継代培養することを必要とする。ほとんどの場合、個々の単離されたコロニーの生理学および生化学的特性が、その後、例えば、ある糖の醗酵、選択培地での成長能力などのような当該技術分野で既知の生化学的アッセイにより決定される。

【0009】サンプル中の感染性細菌の同定に今まで使用される上述の普遍的方法は、結果を得るための長い時間（平均約2日である）、ならびに多くの連続の試験（通常サンプルあたり10と30との間の試験）を実施するための長い時間を必要とする。結果を得るのに本質的により短い時間を必要としかつ単一試験のみを必要とする方法もまた利用可能である。こうした試験はサンプル中に存在する細菌により発現される特異的抗原の検出を基礎とする。この目的上、特定の型の細菌群に属する細菌細胞によってのみかつ異なる細菌群の型に属する細菌細胞によってでなく発現される抗原に結合することが可能である抗体、すなわち細菌特異的MAbを使用することが必要である。こうしたMAbはまた、それらにより認識される抗原を発現する細菌群に属する全ての細菌細胞に結合する能力も有する、すなわち高感受性を有するものでもあるべきである。

【0010】試験されるサンプル中の感染性細菌の検出および感染した試験されるサンプル中に存在する特定の型の細菌の同定のための多数の方法および系が既知であり、それらは特異的抗細菌抗体を利用する。これらの方法の大部分は既知の酵素免疫測定法（ELISA）もしくは多様な凝集アッセイの使用を必要とする。こうした一方法は、例えばハヤシ（Hayashi-K）ら、（感染症学雑誌、65：457-464、1991）に記述され、ここではELISAキットがトラコーマクラミジア（*Chlamydia trachomatis*）抗原の検出に使用される。こうした方法の別の例は、ファリントン（Farrington, M）ら、J. Clin. Pathol.、44：670-675、1991に記述され、ここでは逆受動血球凝集微小力価に基づくアッセイ（reverse passive hemagglutination microtiter based assay）が、連鎖球菌のグループ分けに使用された。

【0011】上の方法は今日、主として、培養系で成長することが困難もしくは不可能のいずれかである種類の細菌の検出に、または真核生物細胞内部で成長するこうした細菌（例えばヒト結核菌（*M. tuberculosis*）、クラミジア属（*Chlamydia*）の種など）に使用される。

【0012】培養系で比較的容易に成長することが可能である、大腸菌（*E. coli*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）の種、エンテロバクター属（*Enterobacter*）の種のような細菌群に属する細菌細胞により発現される抗原を結合することが可能なMAbもまた記述され、そして商業的に入手可能である。しかしながら、入手可能な抗細菌モノクローナル抗体の多くは、高度に信頼できる同定結果

を与えるためには十分に感受性でないおよび／もしくは十分に特異的でない。いくつかの抗体は、細菌の濃度がある臨界濃度以下であるサンプル中の感染性細菌細胞の存在を検出することができない。他の抗体は高度に交差反応性である、すなわちいくつかの型の細菌株に属する細胞もしくは試験されるサンプル中にその時点で存在する非細菌性成分（細胞破片のような）に存在する抗原に結合し、そして結果として試験されるサンプル中の感染性細菌の適正な分類が可能でない。こうした抗体の低い感受性もしくは特異性のため、それらを利用する方法は多数の偽陽性もしくは偽陰性の結果を生じさせることがある。

#### 【0013】

【発明の構成】本発明に従い、上述の利用可能な方法より本質的に迅速である（約2日に比較して2～3時間）直接の方法により、培養系で比較的容易に成長する種類の感染性細菌を検出かつ同定することが可能になった。高度に感受性かつ高度に特異的なモノクローナル抗体の利用を基礎とする本発明の方法はまた、感染性細菌の同定に単一試験のみを必要とする。

【0014】不特定細菌細胞に小さな程度結合するもしくは全く結合しない一方で特定の細菌細胞に大きな程度結合することが可能なモノクローナル抗体、すなわち高感受性および高特異性を有する特異的抗細菌モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を提供することが、本発明の主目的である。

【0015】本発明の一面に從えば、かように、高い感受性および特異性を有する特異的抗細菌モノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞株が提供される。こうしたハイブリドーマ細胞株の特定の態様は、腸内細菌科（*Enterobacteriaceae*）、大腸菌（*E. coli*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）の種、シュードモナス属（*Pseudomonas*）の種およびプロテウス属（*Proteus*）の種に感受性かつ特異的であるモノクローナル抗体（MAb）を産生するものである。

【0016】本発明に従ったハイブリドーマ細胞株の具体例は以下のとおりである。すなわち

1. 受託番号第97061801号のもとに、ヨーロッパアンコレクションオブセルカルチャーズ（European Collection of Cell Cultures）（ECCACC）の応用微生物学および研究センター（Centre for Applied Microbiology and Research）（CAMR）の寄託機関に97年6月18日付で寄託された、本明細書で「抗大腸菌（*E. coli*）」ハイブリドーマと称されるハイブリドーマ細胞株。

【0017】2. 受託番号第97021226号のもとにCAMR/ECCACCの寄託機関に97年2月12日付で寄託された、本明細書で「抗クレブシエラ属（*Klebsiella*）」ハイブリドーマと称されるハイブリドーマ細胞株。

【0018】3. 受託番号第97061802号のもと

にCAMR/ECACCの寄託機関に97年6月18日付で寄託された、本明細書で「抗シュードモナス属(Pseudomonas)」ハイブリドーマと称されるハイブリドーマ細胞株。

【0019】4. 受託番号第97061803号のもとにCAMR/ECACCの寄託機関に97年6月18日付で寄託された、本明細書で「抗プロテウス属(Proteus)」ハイブリドーマと称されるハイブリドーマ細胞株。

【0020】5. 受託番号第97021227号のもとにCAMR/ECACCの寄託機関に97年2月12日付で寄託された、本明細書で「抗腸内細菌科(Enterobacteriaceae)」ハイブリドーマと称されるハイブリドーマ細胞株。

【0021】ハイブリドーマの調製のため、本発明に従い、宿主例えばマウスを、一細胞株の細胞で免疫し、そして、数回の再現する免疫感作を受けさせた後、それらの脾を取り出す。細胞懸濁液を脾から調製し、そして免疫されたマウスから得られる抗体産生細胞を、融合パートナー例えばマウス融合パートナーと融合させる。一例は当該技術分野で既知の融合法の一による非分泌性骨髓腫細胞株NSO/1である(例えばコーラー(Kohler G.)とミルシュタイン(Milstein C.)、Nature、256: 495-497、1975)。ハイブリドーマ細胞株の上清を、典型的には、酵素免疫測定法(ELISA)もしくはラジオイムノアッセイ(RIA)によるように当該技術分野で既知の方法のいずれか1種により抗体結合活性についてスクリーニングする。抗細菌MAbを産生するハイブリドーマの上清を、上述の方法の1種を使用し、特定の細菌細胞に結合するそれらの能力により抗細菌抗体の産生についてスクリーニングする。本発明に従って選択されたハイブリドーマ細胞株により産生される抗体を単離するためには、好ましくは、このハイブリドーマ細胞株を適する培地中でインビトロで培養し、ここで所望のモノクローナル抗体を上清から回収する。いくつかの場合においては、抗細菌ハイブリドーマにより分泌されるMAbはまた、ハイブリドーマ細胞株をマウスに腹腔内

(i. p.) 注入しそしてその後注入されたマウスにおいて形成された悪性の腹水もしくは注入されたマウスの血清からハイブリドーマにより分泌される抗体を回収することにより得ることができる。多様な目的上、選択されたハイブリドーマの上清はまた、上清からのモノクローナル抗体のさらなる単離なしに使用してもよい。

【0022】本発明の追加の態様により、上述のハイブリドーマ細胞株のいずれか1種により産生されるMAbが提供される。こうしたMAbは

(i) 抗細菌MAb、例えば抗大腸菌(E. coli)、抗腸内細菌科(Enterobacteriaceae)、抗プロテウス属(Proteus)、抗クレブシエラ属(Klebsiella)もしくは抗シュードモナス属(Pseudomonas)特異的MAb;

(ii) 抗体全体の抗原結合性の特徴を保持する(i)の

抗体の断片;ならびに

(iii) 上の(i)および(ii)の抗体のいずれか1種により結合される抗原エпитープに結合することが可能な抗体、から成る群から選択される。

【0023】抗大腸菌(E. coli)特異的ハイブリドーマ細胞株により分泌されるモノクローナル抗体は、本明細書で「抗大腸菌(E. coli)特異的MAb」と称することができ、抗腸内細菌科(Enterobacteriaceae)特異的ハイブリドーマにより分泌される抗体は「抗腸内細菌科(Enterobacteriaceae)特異的MAb」と称することができ、抗プロテウス属(Proteus)細胞株により分泌される抗体は「抗プロテウス属(Proteus)特異的MAb」と称することができ、抗クレブシエラ属(Klebsiella)細胞株により分泌される抗体は「抗クレブシエラ属(Klebsiella)特異的MAb」と称することができ、そして抗シュードモナス属(Pseudomonas)のハイブリドーマ細胞株により分泌される抗体は「抗シュードモナス属(Pseudomonas)特異的MAb」と称することができる。

【0024】本発明の診断的態様に従えば、本発明の抗体を含んで成る組成物が、試験されるサンプル中の細菌の存在を検出するためおよび当該サンプル中の感染性細菌の型を同定するための診断に使用される。本発明は、従って、そのさらなる態様の一により、適するキャリアーと一緒にして上述の抗体の最低1種に属するMAbを含んで成る診断試薬組成物を提供する。当該キャリアーは、当該技術分野で既知の生理学的に許容できる緩衝液のいずれか1種(例えばPBS)のような可溶性キャリアーもしくは例えばラテックスビーズのような固形相キャリアーのいずれかであってよい。

【0025】本発明に従えば、診断の目的上、体液試料を、まず、感染した細菌の調製物について試験されるべき個体から得る。当該試料は、直接、もしくは得られた試料中に存在する感染性細菌の成長および単離を可能にする条件下で培養した後のいずれかに試験してよい。あるいは、得られたサンプル中の感染性細菌の存在を、最初に、サンプル中に存在する細菌を染色することが可能な化学的非特異的染色アッセイのような当該技術分野で既知の方法のいずれかを使用することにより検出してもよい。さらに他の場合において、特定の種類の細菌により引き起こされる疾患に典型的な症状がサンプルを得た個体に存在しう。

【0026】得られた試料から調製されたサンプルを、抗体-抗原複合体の形成を許す条件下で本発明の診断試薬組成物と反応させる。こうした複合体は、特異的抗原を発現する細菌細胞への本発明のMAbの結合、もしくは、あるいは、単離された細菌抗原への当該MAbの結合により形成されう。細菌もしくは抗原へのMAbの結合の程度を、その後、例えば免疫蛍光アッセイ、ラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素免疫測定法(ELISA)のような当該技術分野で既知の方法により測

定する。対照サンプル中で観察されるものより有意に高い結合MAbのレベルは、試験されるサンプル中の特定の感染させる細菌の存在を示す。

【0027】本発明に従えば、診断試薬組成物は、単一種類の抗細菌特異的抗体、もしくは、あるいは、異なる区別可能な標識によりそれぞれ標識されるいくつかの型の特異的抗細菌抗体のいずれかを含んでいてもよい。標識は、理論に基づいて(a priori)、モノクローナル抗体に結合されうるか、あるいは、標識は、その後細菌特異的抗体に特異的に結合するキャリア分子に結合されうる。キャリア分子は、例えば、細菌特異的抗体に特異的に結合する抗体であってよい。あるいは、抗体は、ビオチンに結合されていてもよく、そしてキャリア分子がその場合はアビジンを結合されうる。当業者により正しく識別されることができるよう、上の2種の標識の様子はもっぱら例にすぎず、また、特定の細菌細胞への抗細菌抗体の結合を同定させることができるいずれかの他の標識技術を、本発明に従って使用してもよい。

【0028】単一抗体を含んで成る診断試薬組成物を使用する場合は、典型的には、得られた検体からの複数のサンプルを、異なるある種の抗細菌性特異的モノクローナル抗体をそれぞれ含んで成る抗体組成物とともに別個にまた同時にインキュベーションする。それぞれ異なる抗細菌特異性をもつ（そしてそれぞれ例えば異なる色を有するもしくは生じさせる蛍光色素を伴う）複数の本発明のモノクローナル抗体を含んで成る組成物を使用する場合、同時にインキュベーションされるサンプルの数を減少させてもよい。

【0029】上の双方の場合において、診断試薬組成物との試験されるサンプルのインキュベーションは、細菌細胞へのモノクローナル抗体の結合を許すのに十分な時間である。インキュベーションおよび標識の後、微生物は、いくつかの付加的処置（例えばフィルターによる濾過のような）を経てもよく、そしてその後顕微鏡で見るために移動されてよい。例えば、ある蛍光色の検出は、感染したサンプル中のある型の細菌の存在の指標である。

【0030】本発明の最も好ましい態様により、本発明の抗体を含んで成る組成物が迅速診断アッセイで使用される。こうした迅速診断アッセイの一例は、IL特許出願第104351号に記述されるバクティス [Bactis] (商標) システム (コンパクト ディアグノスティック システムズ リミテッド (Combact Diagnostic Systems Ltd.))、イスラエル) である。本発明の抗体の高い感受性および特異性は、それらを、いかなる非特異的結合も結果を著しくゆがめることがあるこうした迅速な試験に最も適するようにする。

【0031】抗体全体の抗原結合の特徴を本質的に維持する本発明の抗体の断片もまた、本発明の範囲内にあ

る。広範囲に記述されるような多様な酵素での抗体全体の分解により得られるFabもしくはF(ab)<sub>2</sub>断片であってよい。抗体もしくはその断片の抗原性の特徴は、RIA、ELISAもしくはFACS分析のような既知の標準的アッセイのいずれか1種を使用して、ある抗原決定基への抗体の結合を試験することにより決定されうる。

【0032】本発明のさらなる治療的局面により、本発明のモノクローナル抗細菌特異的抗体を含んで成る製薬学的組成物を、感染性細菌に結合することが可能なモノクローナル抗体もしくはその部分の治療的有効量をこうした患者に投与することにより、個体での多様な細菌感染症の治療に使用してもよい。治療的に有効な量は細菌感染症の症状を緩和するもしくは個体における細菌細胞の数を減少させることが可能な量である。こうした製薬学的組成物はまた、例えば、原発性もしくは可能性のある再発性の細菌感染症に対する個体の予防もしくは受動免疫にも使用されてよい。この目的上、当該技術分野で既知の方法のいずれか1種により人体に適応された1種もしくはそれ以上の本発明のMAbを含んで成る製薬学的組成物を使用することが好ましいことがある。

【0033】本発明の抗体が特異的に結合する抗原もまた本発明の一態様を構成する。本発明の抗原を含んで成る製薬学的組成物は、注入された抗原を発現する細菌に対する特異的免疫応答を得るための個体の能動免疫に使用しうる。加えて、本発明に従った細菌抗原を含んで成る組成物もまた、試験される個体から得られた身体サンプル中の感染性細菌の検出および同定に使用してよい。こうした個体においては、内因性抗体が、細菌感染の結果として発生していることがある。従って、試験される個体から体液サンプルを得ること、抗原-抗体複合体の形成を可能にする条件下でそれを本発明の抗原とともにインキュベーションすること、形成された複合体のレベルを検出すること、およびそれを対照サンプル中の複合体のレベルと比較することにより、その個体が実際に特定の細菌により感染されているかどうかを決定することが可能である。この目的上、身体サンプルは、典型的には、低レベルの内因性抗体でさえ検出することが可能である血清サンプルであることができる。

【0034】本発明は、さらに、1種もしくはそれ以上の本発明の抗体および/または1種もしくはそれ以上の本発明の抗原、ならびに、試験されるサンプル中に存在する細菌へのこうした抗体もしくは抗原の結合を検出するのに必要とされるいずれかのさらなる試薬を含んで成る、多様な細菌感染症の診断もしくは治療における使用のためのキットを提供する。

【0035】

【実施例】本発明は、今や、以下の実施例によって具体的に説明されることができ、これらは制限であると解釈されるべきでない。

【0036】材料および方法

以下の略語が下の記述において使用されることができ  
る。すなわち

ATCC—アメリカン タイプ カルチャー コレクシ  
ョン(American Type Culture Collection)

I g—免疫グロブリン

BSA—ウシ血清アルブミン

FITC—蛍光イソチオシアネート

MAb—モノクローナル抗体

PBS—リン酸緩衝生理的食塩水

RAM Ig—ウサギ抗マウス免疫グロブリン

TSB—トリプトースダイズ培地(tryptose soy broth)

OPD—オルトフェニレンジアミン

HRP—ワサビペルオキシダーゼ

1. 免疫のための細菌の調製：細菌株(ATCC/突然  
変異株/臨床分離物)を、典型的にヴィテク GNIカ

ード(Vitek GNI card) (バイオメリー(bioMerieux)、  
ヴィテク インク(Vitek Inc.)、米国)である従来の方  
法を使用して同定した。以下で、この方法は「参照法」  
と称するであろう。

【0037】免疫のため、細菌細胞をTSBに接種し、  
そして攪拌しながら37℃で16~18時間成長させた。細胞  
を収集しそして生理的食塩水(0.15M塩化ナトリウム)  
で3回洗浄した。細胞をその後、およそ10<sup>9</sup>個/mlの濃度  
に生理的食塩水中に再懸濁し、そして100℃に60分間加  
熱した。単一の細菌株もしくは数種の株の混合物のいず  
れか(下の表で示されるような)を、各免疫感作に使用  
した。

【0038】

【表1】

表 1

各種免疫感作プロトコルに使用された細菌株

|                                                     | 初回免疫                                         | 1回目の追加免疫                                    | 2回目の追加免疫                                     | 3回目の追加免疫                          | 4回目の追加免疫     | 追加免疫(第3日)                                  | 追加免疫(第2日)                         |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| 大腸菌(ラフ<br>突然変異株)                                    | K12<br>B                                     | K12<br>B                                    | 576<br>470<br>2131<br>2513<br>653            | 576<br>470<br>2141<br>2513<br>653 |              | 576<br>470<br>2141<br>2513<br>653          | 576<br>470<br>2141<br>2513<br>653 |
| 肺炎球菌( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )<br>(K突然変異株) | K26-1                                        | K26-1                                       | K26-1                                        | K26-1<br>201                      | K26-1<br>201 | K26-1<br>201                               | K26-1<br>201                      |
| 緑膿菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )<br>(K突然変異株)    | 21536*                                       | 21536*                                      | 21536*                                       | 21536*                            |              | 21536*                                     | 21536*                            |
| プロテウス<br>ミドリ<br>ブルガリス<br>ヘンリ                        | 1537*, 29906*<br>515*, 3549*<br>3261*, 3489* | 2876*, 127*<br>1411*, 2502*<br>881*, 33519* | 5422*, 5434*<br>2645*, 13315*<br>671*, 1422* |                                   |              | 2464*, 1858*<br>861*, 2509*<br>3329*, 689* | 2461*, 1861*<br>253329* 6         |

\* コンバット分離物-コンバットの収作物

• ATCCの株

【0039】2. 免疫感作スケジュール

マウス(雌性Ba1b/C、8週齢)を、フロイント不  
完全アジュバント中に乳化された10<sup>8</sup>個の細菌細胞(上  
のように調製された混合物)で2週間間隔で腹腔内に免  
疫した。追加免疫(boost)の数は関与される(involved)  
細菌により変動した。最後の追加免疫を、融合(第0  
日)前第3日(腹腔内)および第2日(静脈内)に、5  
~12週の休止後に与えた。

【0040】3. ハイブリドーマの調製

免疫されたマウス由来の脾細胞およびマウス(非分泌)  
骨髓腫細胞株NSO/1の体細胞融合を、コーラー(Koh  
ler)とミルシュタイン(Milstein)(コーラー(Kohler,  
G.)とミルシュタイン(Milstein, C.), 1975 Nature, 25  
6: 495-497)により発表された方法に従って実施した。

【0041】4. ELISAアッセイを使用した、陽性  
に産生するハイブリドーマの選択

4. 1 ハイブリドーマ培養物由来の上清を、特異的M

A b結合を可能にするよう適切に調製された細菌細胞へ  
の結合活性について試験した。ELISAプレートを、  
免疫感作のために調製された細菌細胞で被覆した。10種  
の別個の細菌株/臨床分離物から成る混合物(合計10<sup>8</sup>  
個の細胞)を各ウェルに添加し、そしてプレートを55℃  
で16~18時間乾燥した。特異的MAb(培養上清に存在)  
の細菌への結合活性を、HRP-ウサギ抗マウスIgおよび基質としてOPDを使用することにより測定した。

【0042】4. 2 特異的ハイブリドーマの選択：所  
望のMAbが特異的である(a)細菌で被覆されたプレ  
ートへのMAbの結合を、所望のMAbが非特異的であ  
る(b)細菌の混合物で被覆されたプレートへの結合と  
比較した。(a)および(b)のレベルを、ブランク  
(MAbを除いた全ての試薬を添加した、ELISAプ  
レート中のウェル)のものと比較した。(a)>(ブラ  
ンク)×5かつ(b)=ブランクの場合、このハイブリ

ドーマを陽性かつ特異的として選択した。

【0043】4. 3 高感受性を表すハイブリドーマの選択：所望のMA b が特異的である12種の別個の細菌株／臨床単離物の代表する最小パネル(panel)で被覆されたELISAプレートへのMA b の結合を測定した。試験されたパネルに対する部分的認識能力を示すハイブリドーマを捨てた。

【0044】5. 産生されたモノクローナル抗体の特徴づけ（感受性および特異性）

5. 1 本発明のMa b を使用しての細菌の同定について：細菌株をTSBに接種し、そしてそれらが中程度の対数期(midlog phase)に到達するまで攪拌しながら成長させた。細胞懸濁液をその後、下の5. 2および5. 3に記述されるように使用した。試験されるサンプルは、試験されるMA b のそれぞれについて、60～80種の対応する細菌分離物および類似の数の非対応（「陰性」）細菌分離物から成った。

【0045】5. 2 MA b およびFITC-RAM Igでのサンプルの間接染色（2段階処理）；前処理された細菌細胞を、培養上清もしくは精製されたMA b （PBS、1%BSA中で希釈された）のいずれかとともに37℃で60分間インキュベーションした。その後、細胞を上希釈液で2回洗浄し、そしてFITC-RAM Ig（PBS、1%BSA中で希釈された）とともに37℃で45分間インキュベーションした。この細胞をその後洗浄しそして顕微鏡で検査した。

【0046】5. 3 ビオチニル化MA b およびFITC-アビジンでの間接染色；細胞培養培地からのMA b の分離および精製。

【0047】ハイブリドーマ細胞を、mg/mlのBSAを含有する血清を含まない培地中での成長に適合させた。MA b の調製物を細胞培養上清から分離しそしてMA b のアイソタイプの性質に従いアフィニティクロマトグラフィー（プロテインA／プロテインG-セファロース）、ゲル濾過もしくはイオン交換クロマトグラフィーのいずれかにより精製した。

【0048】ビオチンでのMA b の標識  
MA b へのビオチンの結合を、ペイヤー(Bayer)とウィルチェック(Wilchek)（ペイヤー(Bayer E. A.)とウィルチェック(Wilchek, M.), Methods in Molecular Biology, Vol. 10: Immunochemical Protocols, Chapter 13: 137-142、マンソン(M. Manson)編、ザ ヒューマン プレス インク(The Human Press Inc.)、ニュージャージー州イオトワ、1992)により発表されたプロトコールに従い、ビオチニルε-アミノカプロイルN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを使用により行った。

【0049】染色手順  
適切に処理された細菌細胞を、ビオチニル化MA b （PBS、1%BSA中で希釈された）とともに37℃で30分間インキュベーションした。FITC-ニュートライ

ト[Nutralite]（商標）（ピアース ケミカル カンパニー(Pierce Chemical Company)）アビジンをその後添加し（PBS、1%BSA中で希釈された）、そして、細胞をその後、37℃で追加の30分間インキュベーションした。この細胞をその後洗浄しそして顕微鏡で検査した。

【0050】6. 尿試料：新鮮な尿試料を、イスラエルのシェバ メディカル センター(Sheba Medical Center)から得た。グラム陰性桿菌を $\geq 10^5$  CFU/ml（スクリーニング処置により検出されるような）の閾値で含有する感染した尿を、本発明のMa b を使用する同定法で試験した。シュードモナス属(Pseudomonas)の種およびプロテウス属(Proteus)の種のような低頻度細菌種の同定を、対応および非対応の細菌分離物でスパイクされた(s piked)かつ自然のまま(native)の尿が処置されたように処置された滅菌尿試料で行った。各尿試料（自然のままもしくはスパイクされたのいずれか）に存在する微生物を、参照法を使用して平行して同定した。

【0051】7. 試験されたMA b の感受性（SE）および特異性（SP）の算出  
MA b の感受性および特異性を、参照法（上を参照）との比較で評価し、そして以下のように算出した。すなわち

【0052】

【数1】

$$\text{感受性 (SE)} = \frac{\text{真の陽性の結果}}{(\text{真の陽性} + \text{偽陰性}) \text{の結果}}$$

$$\text{特異性 (SP)} = \frac{\text{真の陰性の結果}}{(\text{真の陰性} + \text{偽陽性}) \text{の結果}}$$

【0053】8. 抗原の予備的特徴づけ

8. 1 タンパク質加水分解に対する感受性

8. 1. 1 プロテイナーゼKのストック溶液を、プロテイナーゼKを0.02Mトリス塩酸緩衝液pH7.8に溶解することにより調製した（最終濃度0.8mg/ml）。

【0054】8. 1. 2 分解段階を以下のように実行した。すなわち80μgのタンパク質に対応するタンパク質溶液を、2μlの0.5Mトリス塩酸緩衝液pH7.8および2μlの0.25%SDS溶液に添加した。最終体積をDDWで45μlとなるよう調節した。上の混合物を85℃で5分間加熱し、室温に冷却し、エッペンドルフ遠心分離器中で最高速度で30秒間回転させ、そして5μlのプロテイナーゼKストック溶液をその後添加した。プロテイナーゼKに対するタンパク質の量比は20：1であった。分解を室温（R. T.）で2時間続行した。プロテイナーゼK分解に対する感受性を、上の分解処置後のウェスタンブロットで特異的に同定されたバンドの消失により決定した。

【0055】8. 2 イムノブロットングによる特徴



づけ

イムノブロットィングは、Antibodies、ハーロウ (Harlow E.) とレーン (Lane, D)、(編)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、pp. 479-510、1988に記述されるように実施した。

【0056】抗原の分子量の決定を、サンプルから得られたバンドの位置を予め染色された SDS-PAGE 標準品 (パイオラッド ラボラトリーズ (Biorad Laboratories)) と比較することにより実施した。

#### 【0057】結果

抗細菌 MA b の感受性および特異性パラメータの決定  
当該ハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体の特異性および感受性を、ATCCからの基準株から

得られる多数の試験されたサンプルおよび主として尿から分離された多様な供給源 (イスラエルおよび海外の病院) 由来の細菌分離物との、上記のような抗体のインキュベーションにより決定した。サンプルは、下の各場合において特定されるように、A b が特異的に向けられる細菌かもしれない多様な型の他の細菌かのいずれかに感染していた (表 2-6)。

【0058】以下の結果において見られるように、本発明の MA b は、尿サンプル中の感染性細菌の検出および同定において有用であることが示された。当該 MA b の特異性および感受性は上記のように尿試料で直接試験した。

#### 【0059】

【表 2】

### 実施例 1

| 表 2: 腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)            |             |                         |                         |                        |           |           |
|--------------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------|-----------|
| 臨床分離物                                      |             |                         |                         | 尿試料<br>(試験された 117 の試料) |           |           |
| 試験された細菌群                                   | 試験された<br>総数 | FP <sup>1</sup> の<br>結果 | FN <sup>2</sup> の<br>結果 | 検出された<br>総数<br>*       | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 |
| 大腸菌 ( <i>E. coli</i> )                     | 25          |                         |                         | 77                     |           | 1         |
| 肺炎桿菌 ( <i>Klebsiella pneumonia</i> )       | 17          |                         |                         |                        |           |           |
| クレブシエラ オキシカ ( <i>Klebsiella oxytoca</i> )  | 6           |                         |                         |                        |           |           |
| クレブシエラ属の種                                  | -           |                         |                         | 28                     |           | 1         |
| モルガネラ モルガニイ ( <i>Morganella morganii</i> ) | 17          |                         |                         | 3                      |           |           |
| シロバクテラ属の種                                  | 20          |                         |                         | 9                      |           |           |
| エンテロバクテラ属の種                                | 26          |                         | 2                       | 13                     |           |           |
| プロテウス属の種                                   | 15          |                         |                         | 2                      |           |           |
| セラチア属の種                                    | 15          |                         |                         | 2                      |           |           |
| サルモネラ属の種                                   | 2           |                         |                         | -                      |           |           |
| 計 (陽性)**                                   | 143         |                         | 2                       | 134                    |           | 2         |
| プロテウス属の種                                   | 19          |                         | 19                      | 26                     |           | 26        |
| アシネバクテラ属の種                                 | 27          |                         |                         | 8                      |           |           |
| シュードモナス属の種                                 | 35          |                         |                         | 9                      |           |           |
| 計 (陰性)                                     | 62          |                         |                         | 17                     |           |           |
| 感受性 (%)***                                 | 98.6        |                         |                         | 98.5                   |           |           |
| 特異性 (%)                                    | 100         |                         |                         | 100                    |           |           |

\* 参照法により検出された (上を参照)

\*\* プロテウス属 (*Proteus*) の種が除外される (腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) の種特異的 MAbs により同定されない)

\*\*\* 感受性の % および特異性の % の算出については上を参照

<sup>1</sup> FP = 偽陽性

<sup>2</sup> FN = 偽陰性

【0060】

【表 3】

実施例 2

大腸菌(*E. coli*)特異的 Mab:

| 表 3: 大腸菌( <i>E. coli</i> )の同定             |             |           |           |                      |           |           |
|-------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| 臨床分離物                                     |             |           |           | 尿試料<br>(試験された332の試料) |           |           |
| 試験された細菌群                                  | 試験された<br>総数 | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 | 検出された<br>総数<br>*     | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 |
| 大腸菌( <i>E. coli</i> )                     | 80          |           |           | 186                  |           | 9         |
| 陽性計                                       | 80          |           |           | 186                  |           | 9         |
| プロテウス ミラビリス( <i>Proteus mirabilis</i> )   | 17          |           |           | 40                   | 1         |           |
| 肺炎桿菌( <i>Klebsiella pneumonia</i> )       | 32          |           |           | -                    |           |           |
| クレブシエラ オキシタ( <i>Klebsiella oxytoca</i> )  | 6           |           |           | -                    |           |           |
| クレブシエラ属の種                                 |             |           |           | 82                   | 2         |           |
| モルガネラ モルガニー( <i>Morganella morganii</i> ) | 9           |           |           | -                    |           |           |
| シロバクテラ属の種                                 | 14          |           |           | 13                   | 0         |           |
| エンテロバクテラ属の種                               | 20          |           |           | 16                   | 1         |           |
| プロテウス属の種                                  | 9           |           |           | -                    |           |           |
| アシネバクテラ属の種                                | 7           |           |           | 26                   | 1         |           |
| シュードモナス属の種                                | 8           |           |           | 23                   | 1         |           |
| 他のグラム陰性                                   | -           |           |           | 33                   | 0         |           |
| 計(陰性)                                     | 122         |           |           | 233                  | 6         |           |
| 感受性(%)                                    | 100         |           |           | 95.1                 |           |           |
| 特異性(%)                                    | 100         |           |           | 97.4                 |           |           |

\* 参照法により検出された

【0061】

【表4】

### 実施例 3

プロテウス属(*Proteus*)の特異的 MAb:

| 表 4: プロテウス属( <i>Proteus</i> )の種の同定        |                   |           |           |                              |           |           |
|-------------------------------------------|-------------------|-----------|-----------|------------------------------|-----------|-----------|
| 臨床分離物                                     |                   |           |           | 尿試料<br>(試験された85の加えられた<br>試料) |           |           |
| 試験された細菌群                                  | 試験<br>された<br>総数 d | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 | 試験された<br>総数                  | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 |
| プロテウス ミラビリス( <i>Proteus mirabilis</i> )   | 50                |           |           | 24                           | 3         |           |
| プロテウス ヴルガリス( <i>Proteus vulgaris</i> )    | 11                |           |           | 16                           | 1         |           |
| プロテウス ペンネリ( <i>Proteus penneri</i> )      | 17                |           |           | 20                           | 2         |           |
| 計(陽性)                                     | 78                |           |           | 60                           | 6         |           |
| 大腸菌( <i>E. coli</i> )                     | 11                |           |           | 3                            |           |           |
| 肺炎桿菌( <i>Klebsiella pneumonia</i> )       | 7                 |           |           | 2                            |           |           |
| クレブシエラ オキシタ( <i>Klebsiella oxytoca</i> )  | 4                 |           |           | -                            |           |           |
| モルガネラ モルガニイ( <i>Morganella morganii</i> ) | 5                 |           |           | 2                            |           |           |
| シトロバクテラ属の種                                | 7                 | 1         |           | 3                            |           |           |
| エンテロバクテラ属の種                               | 8                 |           |           | 1                            |           |           |
| プロビデンス属の種                                 | 4                 |           |           | 1                            |           |           |
| セラチア レトケリ( <i>Serratia rettgeri</i> )     | 1                 |           |           |                              |           |           |
| アシネバクテラ属の種                                | 10                |           |           | 1                            |           |           |
| シュードモナス属の種                                | 6                 |           |           | 12                           |           |           |
| 計(陰性)                                     | 63                | 1         |           | 25                           |           |           |
| 感受性(%)                                    | 100               |           |           | 90                           |           |           |
| 特異性(%)                                    | 98.4              |           |           | 100                          |           |           |

【0062】

【表5】

# 実施例 4

シュードモナス属(*Pseudomonas*)の種特異的MAb:

| 表 5: シュードモナス属( <i>Pseudomonas</i> )の種の同定  |             |           |           |                              |                |           |
|-------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|------------------------------|----------------|-----------|
| 臨床分離物                                     |             |           |           | 床試料<br>(試験された86の加えられた<br>試料) |                |           |
| 試験された細菌群                                  | 試験された<br>総数 | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 | 試験<br>された<br>総数              | FPの<br>結果<br>s | FNの<br>結果 |
| 緑膿菌( <i>P. aeruginosa</i> )               | 67          |           | 1         | 45                           |                | 4         |
| P.プティダ( <i>P. putida</i> )                | 18          |           |           | 15                           |                | 1         |
| P.スツゼリ( <i>P. stutzeri</i> )              | 2           |           |           |                              |                |           |
| P.ファシリス( <i>P. facilis</i> )              | 1           |           |           |                              |                |           |
| P.セパシア( <i>P. cepacia</i> )               | 2           |           |           |                              |                |           |
| P.フルオレンス( <i>P. fluorescens</i> )         | 1           |           | 1         |                              |                |           |
| P.ディミヌタ( <i>P. diminuta</i> )             | 4           |           | 4         |                              |                |           |
| 計(陽性)                                     | 95          |           | 6         | 60                           |                | 5         |
| 大腸菌( <i>E. coli</i> )                     | 13          |           |           | 2                            |                |           |
| 肺炎桿菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )      | 11          |           |           | 2                            |                |           |
| クレブシエラ オキシトカ( <i>Klebsiella oxytoca</i> ) | 5           |           |           | 1                            |                |           |
| モルガネラ モルガニイ( <i>Morganella morganii</i> ) | 7           |           |           | 2                            |                |           |
| プロテウス属の種                                  | 12          |           |           | 12                           |                |           |
| シロバクテラ属の種                                 | 8           |           |           | 2                            |                |           |
| エンテロバクター属の種                               | 9           |           |           | 2                            |                |           |
| プロビデンス属の種                                 | 3           |           |           | 1                            |                |           |
| アシネトバクター属の種                               | 9           |           |           | 2                            |                |           |
| 計(陰性)                                     | 77          |           |           | 26                           |                |           |
| 感受性(%)*                                   | 98.5        |           |           | 91.6                         |                |           |
| 特異性(%)                                    | 100         |           |           | 100                          |                |           |

\* シュードモナス ディミヌタ(*Pseudomonas diminuta*)およびシュードモナス フルオレンス(*Pseudomonas fluorescens*)を含まない。

(シュードモナス フルオレンス(*Pseudomonas fluorescens*))は臨床的重要性をもたず小さい悪性を有する。

シュードモナス ディミヌタ(*Pseudomonas diminuta*)は臨床環境においてまれに通過される。

【0063】

【表 6】

# 実施例 5

## クレブシエラ属(*Klebsiella*)の種特異的 MAbs:

| 表 6: クレブシエラ属( <i>Klebsiella</i> )の種の同定   |             |           |           |                      |           |           |
|------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| 臨床分離物                                    |             |           |           | 原試料<br>(試験された332の試料) |           |           |
| 試験された細菌群                                 | 試験された<br>総数 | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 | 検出された<br>総数<br>*     | FPの<br>結果 | FNの<br>結果 |
| 肺炎桿菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )     | 50          |           | 6         | -                    |           |           |
| クレブシエラ オキシカ( <i>Klebsiella oxytoca</i> ) | 10          |           |           | -                    |           |           |
| クレブシエラ属の種                                | -           |           |           | 82                   |           | 5         |
| 計(陽性)                                    | 60          |           | 6         | 82                   |           | 5         |
| 大腸菌( <i>E. coli</i> )                    | 57          |           |           | 186                  | 8         |           |
| プロテウス ミラビリス( <i>Proteus mirabilis</i> )  | 17          | 2         |           | -                    |           |           |
| プロテウス属の種                                 | -           | -         |           | 40                   | 2         |           |
| モルガネラ モルガニ( <i>Morganella morganii</i> ) | 9           | 1         |           | -                    | -         |           |
| シトロバクター属の種                               | 14          | 5         |           | 13                   | 5         |           |
| エンテロバクター属の種                              | 20          | 2         |           | 16                   | 1         |           |
| プロビデンス属の種                                | 9           | 1         |           | -                    | -         |           |
| アシネバクター属の種                               | 7           |           |           | 26                   | 4         |           |
| シュートモナス属の種                               | 8           |           |           | 23                   |           |           |
| 他のグラム陰性                                  | -           |           |           | 33                   | 1         |           |
| 計(陰性)                                    | 141         | 11        |           | 337                  | 21        |           |
| 感受性(%)                                   | 90.0        |           |           | 93.9                 |           |           |
| 特異性(%)                                   | 92.2        |           |           | 93.7                 |           |           |

【0064】実施例 6 \* 参照法により検出される  
本発明のMA bが結合する抗原の予備的特徴づけ

### 6. 1 大腸菌(*E. coli*)

本発明の大腸菌(*E. coli*)特異的MA bにより認識される抗原は、プロテイナーゼK分解に感受性であることが見出された。これは、タンパク質分解性分解後のウェスタンブロットでの特異的バンドの消失により証明された(手順については上を参照)。超音波処理された大腸菌(*E. coli*)の細菌から調製された大腸菌(*E. coli*)抗原の分子量をウェスタンブロットにより測定し、そして約11,000ないし約14,000の間であることが見出された。

【0065】6. 2 腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)  
抗原: 本発明の腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)特異的MA bにより同定される抗原は、プロテイナーゼK分解に感受性であることが見出された(上記のように決定される)。この抗原の分子量は、上述の大腸菌(*E. coli*)抗原のものと同様、すなわち約11,000~14,000の範囲にあることが見出された。

【0066】6. 3 クレブシエラ属(*Klebsiella*)抗  
原: 本発明のクレブシエラ属(*Klebsiella*)特異的MA bにより同定される抗原は、プロテイナーゼK切断に感受性でないことが見出された(上記のように決定され

る)。この抗原は細菌性リポ多糖(LPS)を伴うことが見出された。

【0067】なお、本発明の主要な特徴もしくは態様を以下に挙げる。

【0068】1. 特定の細菌細胞に大きな程度結合することが可能なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株であって、前記抗体が不特定の細菌細胞に小さな程度結合可能であるかもしくは全く結合できないハイブリドーマ細胞株。

【0069】2. 前記特定の細菌細胞が、培養により成長することが比較的容易である種類のものである、請求項1に従ったハイブリドーマ細胞株。

【0070】3. 受託番号第97061801号のもとに、ヨーロピアン コレクション オブ セル カルチャーズ(European Collection of Cell Cultures)(E C A C C)の応用微生物学および研究センター(Centre for Applied Microbiology and Research)(CAMR)の寄託機関に97年6月18日付で寄託された、大腸菌(*E. coli*)の種に特異的なモノクローナル抗体を産生することが可能なハイブリドーマ細胞株(「抗大腸菌(*E. coli*)ハイブリドーマ」)。

【0071】4. 受託番号第97021226号のもと

にCAMR/ECACCの寄託機関に97年2月12日付で寄託された、クレブシエラ属(*Klebsiella*)の種に特異的なMA bを産生することが可能なハイブリドーマ細胞株(「抗クレブシエラ属(*Klebsiella*)ハイブリドーマ」)。

【0072】5. 受託番号第97061802号のもとにCAMR/ECACCの寄託機関に97年6月18日付で寄託された、シュードモナス属(*Pseudomonas*)の種に特異的なMA bを産生することが可能なハイブリドーマ細胞株(「抗シュードモナス属(*Pseudomonas*)ハイブリドーマ」)。

【0073】6. 受託番号第97061803号のもとにCAMR/ECACCの寄託機関に97年6月18日付で寄託された、プロテウス属(*Proteus*)の種に特異的なMA bを産生することが可能なハイブリドーマ細胞株(「抗プロテウス属(*Proteus*)ハイブリドーマ」)。

【0074】7. 受託番号第97021227号のもとにCAMR/ECACCの寄託機関に97年2月12日付で寄託された、腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)の種に特異的なMA bを産生することが可能なハイブリドーマ細胞株(「抗腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)ハイブリドーマ」)。

【0075】8. (i) 抗大腸菌(*E. coli*)特異的なMA b、抗腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)特異的なMA b、抗プロテウス属(*Proteus*)特異的なMA b、抗クレブシエラ属(*Klebsiella*)特異的なMA bもしくは抗シュードモナス属(*Pseudomonas*)特異的なMA b；

(ii) 抗体全体の抗原結合性の特徴を保持する(i)の抗体の断片；ならびに

(iii) 上の(i)および(ii)の抗体のいずれか1種により結合される抗原エピトープに結合することが可能な抗体、から成る群から選択される、先行する1～7のいずれかのハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体。

【0076】9. 適するキャリアーと一緒に前記

8に記載の最低1種のモノクローナル抗体もしくはその断片を含んで成る、診断試薬組成物。

【0077】10. 抗細菌抗体が標識される、前記9に記載の診断試薬組成物。

【0078】11. 前記8に記載の抗体のいずれか1種に結合することが可能な抗原。

【0079】12. 前記8に記載の抗体の最低1種を含んで成る、細菌感染症の診断もしくは治療における使用のためのキット。

【0080】13. 前記11に記載の最低1種の抗原を含んで成る、細菌感染症の診断もしくは治療における使用のためのキット。

【0081】14. (i) 試験されるべき個体から流体試料を得ること；

(ii) 前記得られた試料から多数のサンプルを調製すること；

(iii) 前記9に記載の診断試薬組成物と前記サンプルのそれぞれを反応させることであって、前記組成物のそれぞれが異なる1種の抗細菌特異的なMA bを含んで成り、前記MA bのそれぞれが抗体-抗原複合体の形成を許す条件下で検出可能な標識で標識される、そして

(iv) 前記特定の細菌への前記診断試薬組成物のそれぞれの結合の程度を検出することであって、対照サンプルで観察されるものより有意に高い結合のレベルが、サンプル中の前記特定の感染させる細菌の存在を示し、かつ、前記試験される個体における細菌感染症の実在を示す、の段階を含んで成る、個体における細菌感染症の診断法。

【0082】15. 単一サンプルのみが段階(ii)において調製される、前記14に記載の方法であって、前記サンプルは段階(iii)において1種以上の抗細菌特異的なMA bを含んで成る診断試薬組成物と反応され、前記MA bのそれぞれが異なる検出可能な標識により標識される方法。

フロントページの続き

| (51)Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I            | テーマコード(参考) |
|---------------------------|-------|----------------|------------|
| A 6 1 K 39/395            | A D Z | A 6 1 K 39/395 | A D Z R    |
| C 0 7 K 14/21             |       | C 0 7 K 14/21  |            |
|                           |       | 14/24          |            |
|                           |       | 14/26          |            |
|                           |       | 14/265         |            |
|                           |       | 14/425         |            |
|                           |       | 16/12          |            |
| C 1 2 N 5/10              |       | G 0 1 N 33/577 | B          |
| G 0 1 N 33/577            |       | C 1 2 P 21/08  |            |
| // C 1 2 P 21/08          |       | C 1 2 N 5/00   | B          |

F ターム(参考) 4B024 AA13 BA50 GA03 GA18 HA15  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15  
4B065 AA91X AA92X AB05 AC14  
BA08 BA24 CA25 CA44 CA46  
4C085 AA11 AA14 AA19 BA15 BA19  
BA21 BA22 CC02 DD33 DD34  
DD35 EE01 EE03  
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA76  
EA29 EA52 FA72